

# Development of membrane excitability during the in vitro differentiation of a clonal mouse myogenic cell line

著者	Amagai Yuji
内容記述	Thesis--University of Tsukuba, D.Sc.(B), no. 587, 1990.3.23
発行年	1990
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/5228">http://hdl.handle.net/2241/5228</a>

氏 名 (本 籍)	あま がい ゆう じ 天 貝 裕 地 (東 京 都)
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	博 乙 第 587 号
学位授与年月日	平成 2 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	生 物 科 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	Development of membrane excitability during the in vitro differentiation of a clonal mouse myogenic cell line. (マウスクローン筋原性細胞株の培養下での分化に伴う興奮性発達)
主 査	筑波大学教授 理学博士 渋谷 達 明
副 査	筑波大学教授 理学博士 内 藤 豊
副 査	筑波大学教授 理学博士 猪 川 倫 好
副 査	筑波大学助教授 理学博士 斎 藤 建 彦

## 論 文 の 要 旨

筋肉や神経系の興奮性細胞が発生分化にともなって興奮性をいかに獲得してゆくか、その過程を究明するにはそれらの細胞を培養条件下で分化させ、興奮性の発達を追跡するのがきわめて有効と思われる。本論文はこれまで不明であった細胞における興奮性の獲得過程を解明したものであるが、そのために分化能を維持する細胞株 MC 3 T 3 -A1 を新生マウス頭蓋冠から分離し、継代培養を成功させ、骨格筋細胞にあたる多核の筋管細胞、特に細胞融合が速やかであると共に活動電位発生の速さの点で優れたクローン M13 を得ることができた。この培養細胞を用いて、分化に伴う興奮性発達過程を明らかにした。

樹立された筋原性細胞株 MC 3 T 3 -A1 のクローン M13 細胞は、飽和状態になると局所的に細胞融合をおこし多核、管状の収縮性をもつ巨大細胞となった。細胞の増殖と分化の頻度は 10% 血清条件では、はじめ急速に分裂し、4 日目から分裂指数が直線的に下降しはじめ、6 日目に約  $2 \times 10^5$  細胞/ $\text{cm}^2$  の飽和密度に達し増殖を停止した。一方細胞融合による筋管細胞形成は 10 日目までに融合指数が 80% に達した。

増殖期の細胞の静止電位は  $-22.5 \text{ mV}$ 、成熟度により  $-25 \text{ mV}$  から  $-70 \text{ mV}$  まで変動した。膜抵抗、膜容量は  $2.6 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ ,  $3.1 \mu \text{ F/cm}^2$  であった。培養 5 日目の筋管細胞では膜電位依存 K チャンネルの発達が確認された。また 6 日目には過分極通電の開放により Na 活動電位が生じた。その最大立ち上り速度は 8 日目に  $300 \text{ V/sec}$  に達した。電位変化に対する各種チャネル阻害剤による影響を調べると鋭い立ち上がりの活動電位はテトロドトキシン不感受性 Na チャンネル、およびテトラエチルアンモニウ

ム感受性Kチャンネルにより生ずることが明らかになった。一方電圧固定化で、持続性Ca電流と一過性のNa電流の二つが記録された。特にこのCaチャンネルは高閾値、持続性のL型Caチャンネルと同じものと推定された。

また、CaおよびNaの二つのチャンネルの発達過程は、前者では培養5日目ですでに現われ、7日目には立ち上がり速度はピーク（26 V/sec）に達し14日目には消失した。後者は6日目に現れ9日目にはピークに達しその後維持された。この結果M13細胞におけるCaチャンネルの発達は、分化初期に限定された一時的のものであることが明らかになった。

## 審 査 の 要 旨

MC 3 T 3 -A1 /M13細胞は、培養下での骨格筋細胞分化を追跡する系としてきわめて有効である。さらに融合直後から興奮性の発達が認められ、興奮膜の発達過程を追う系として優れており、この培養系樹立は評価されよう。また骨格筋繊維Na活動電位のテトロドトキシン感受性は支配神経からの神経栄養要素に依存するとされており、この観点から本細胞株が各種要素の検定にも利用できる可能性がある。興奮膜の分化初期におけるCaチャンネルの発達は系統発生的意味をも考察でき、また骨格筋細胞のそれは興奮-収縮の連関における役割などにも示唆を与え、これら分化にともなう興奮膜の発達過程は今後の膜生理学分野の研究に大きく寄与すると考えられ高く評価される。

よって、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。